植 物 分 类 与 资 源 学 报 2012, **34** (1): 28~32
Plant Diversity and Resources DOI: 10.3724/SP. J. 1143. 2012. 11103

拟南芥叶边缘锯齿状突变体的分离与鉴定*

李婉莎，王春涛，胡向阳**
(中国科学院昆明植物研究所，云南 昆明 650201)

摘要：叶的极性建立直接决定叶的平展性发育，极性改变导致叶形态异常，影响植物体的各种正常生理活动。利用反向遗传学方法，从拟南芥基因激活标签突变体库中分离到一个叶片边缘锯齿状表型的突变体(命名为 pCB1294)，该突变体同时表现出叶表皮腺毛形态发育异常。通过 Tail-PCR 方法成功定位突变基因为 *At5g41663*，该基因编码 *miR319b* 基因。Real time PCR 显示，pCB1294 突变体植株中 *miR319b* 基因的表达量是野生型（col）植株的 11 倍多。所得结果为进一步研究 miRNA 调控叶极性的分子机制和进一步分析 *miR319b* 与叶形态发生的关系奠定了基础。

关键词：拟南芥；突变体；叶锯齿；Tail-PCR；miRNA
中图分类号：Q 75 **文献标识码**：A **文章编号**：2095-0845(2012)01-028-05

Isolation and Identification of an *Arabidopsis thaliana* Mutant with Serration Leaf Margin

LI Wan-Sha, WANG Chun-Tao, HU Xiang-Yang**
(*Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China)

Abstract: Leaf polarity determines leaf flatness development directly, and abnormal polarity usually results in many abnormal leaves, which subsequently affects many physiological functions of plants. So the normal leaf development is important to plants. Here, an abnormal serration leaf margin mutant with abnormal leaf trichome development, named pCB1294, was isolated from an activation tagging *Arabidopsis* mutant pool through reverse genetics. By Tail-PCR, the mutant gene loci *At5g41663* encoding *miR319b* was successfully identified. Real time PCR shows the relative expression level of *miR319b* gene in the pCB1294 mutant is eleven times of higher than that of the wild (col). Our study lay the foundation for further studying the genetic mechanism of leaf polarity and investigating the interaction between *miR319b* and leaf morphology.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; Mutant; Leaf margin serration; Tail-PCR; miRNA

叶是植物体的基本营养器官之一，在植物的生命活动中起着重要作用，研究植物叶的发生、发育的分子机理，是发育生物学的一个重要课题。叶片发育的阶段大致可分为：叶原基的起始和叶极性的建立（Smith 和 Hake，1992）。叶原基是在茎的顶端分生组织（Shoot apical meristem，SAM）中形成的（Scanlon，2000；Hudson，1999）。叶极性的建立是叶发育的核心环节。

Tsukaya（2005）的新细胞决定理论认为，叶边缘锯齿、叶卷曲是某些直接或间接影响细胞分裂或生长分化的基因突变造成的。从叶形成的分子机制上看，SAM 细胞及周边细胞的发育形成叶原基，叶原基产生极性分化并从细胞分裂状态转入细胞生长阶段，平展、正常的叶片逐渐形成。控制这一发

* 基金项目：中国科学院百人计划项目与国家自然科学基金项目（30871704，30971452，31170256）
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：huxiangyang@ mail. kib. ac. cn
收稿日期：2011-07-05，2011-10-15 接受发表
作者简介：李婉莎（1979-）女，硕士，主要从事植物分子生物学和功能基因组学研究。

育进程的一系列基因的突变及影响细胞分裂、生长分化的因素都有可能使叶发育异常，产生卷曲、锯齿状等异型叶片（Huang，2003；Tsukaya，2005）。

近年来研究表明，miRNA 在植物叶极性的分化方面具有重要的调节作用。Palatnik 等（2003）通过对 *jaw-D* 基因进行突变研究，发现 *miR319a* 能通过靶向作用于 *TCP* 转录因子基因家族来调控植物叶形态建成。*miR319a* 基因在芽顶端组织、花器官和果实中表达，*miR319a* 基因过表达突变体产生叶片卷曲、花发育异常、叶片偏上生长、果实畸形等异常表型。西红柿中，*LA* 基因编码一个包含 *miR319* 位点的 *TCP* 转录因子，*miR319* 通过介导 *LA* 基因调控叶边缘细胞发育。*LA* 表达水平升高，导致叶边缘发育异常化；降低 *LA* 表达水平，则使叶边缘细胞持续生长（Ori 等，2007）。

金鱼草 *cin*（*cincinnata*）突变体由于细胞在叶边缘的分裂延长，导致突变体叶片皱褶，*CIN* 编码一个 *TCP* 转录因子，金鱼草 *cin* 和拟南芥 *jaw-D* 突变体具有相似的叶片边缘卷曲表型。在这两个突变体中，*TCP* 基因的表达调控受到 miRNA 的介导，影响细胞分裂的时空特性，进而在叶的发育中起到调控作用（Nath 等，2003；Palatnik 等，2007）。

叶的近轴面决定基因家族 ClassIII HD-ZIP 成员是 *miR165/166* 的靶基因。*HYL1* 是 miRNA 形成过程中一个重要的基因，*HYL1* 基因通过介导 miRNA 来调节 ClassIII HD-ZIP 基因的表达；在叶上卷突变体中，*miR165* 水平降低，近轴面决定基因 *REV* 被上调，同时叶的远轴区域也受到影响，导致远轴面决定基因 *FIL* 被下调，叶背腹极性丧失，产生叶片翻卷现象（Yu 等，2005）。

突变体分析是研究叶形态发生机制的最好方法之一，拟南芥和其它一些植物突变体已被广泛应用于植物发育及代谢途径的研究中。本研究利用基因激活标签法构建突变体库，并从中筛选了一个叶发育异常突变体进行研究。突变体表型为：叶片边缘锯齿状、叶片卷曲、叶表皮细胞窄小、果荚皱缩、叶片表皮腺毛结构异常等。通过 Tail-PCR 方法成功定位该突变体突变基因为 *At5g41663*。本研究为下一步探究该突变基因与叶形态发育的关系，进一步阐明叶发育的分子调控网络奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　材料

拟南芥叶边缘锯齿状突变体 pCB1294 是从实验室前期构建的拟南芥基因激活标签突变体库中筛选得到的，该突变体库遗传背景为 *colombia* 生态型（col）。

1.2　突变体表型观察

突变体和野生型种子同时播种于土壤中，温室（25℃）正常生长，观察表型、拍照。取突变体叶片、茎杆、果荚固定于 FAA 固定液中，扫描电镜观察表型。

1.3　突变体基因定位

运用 Tail-PCR 方法分离突变体 T-DNA 侧翼序列（Liu 等，1995）。程序：Tail-1：94℃ 2 min；95℃ 1 min；94℃ 30 s，62℃ 1 min，72℃ 2.5 min，5 个循环；94℃ 30 s，25℃ 3 min（50% ramp），72℃ 3 min（32% ramp），2 个循环；94℃ 10 s，68℃ 1 min，72℃ 2.5 min，94℃ 10 s，68℃ 1 min，72℃ 2.5 min，94℃ 10 s，44℃ 1 min，72℃ 2.5 min 15cycles；72℃ 7 min。Tail-2（将第一轮产物稀释 50 倍取 1 μL 作为第二轮反应的模板）：94℃ 3 min；94℃ 10 s，64℃ 1 min，72℃ 2.5 min，5cycles；94℃ 10 s，64℃ 1 min，72℃ 2.5 min，94℃ 10 s，64℃ 1 min，72℃ 2.5 min，94℃ 10 s，44℃ 1 min，72℃ 2.5 min，15cycles；94℃ 10 s，44℃ 1 min，72℃ 2.5 min，5cycles；72℃ 7 min。Tail-3（将第二轮产物稀释 12.5 倍取 1 μL 做第三轮模板）：94℃ 10 s，44℃ 1 min，72℃ 2.5 min，30cycles；72℃ 7 min。所用引物为特异引物、简并引物，见表 1。

1.4　T-DNA 插入位点鉴定

分别提取 col、pCB1294 基因组 DNA，采用三引物法鉴定，在 pCB1294 突变体 T-DNA 插入位点两侧的基因组序列上设计两个引物（LP、RP），与 T-DNA 左边界引物（LB3）扩增（http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html）。以 col 野生型植株基因组 DNA 作为对照，分别以 pCB1294-LP \ LB3、pCB1294-RP \ LB3、pCB1294-LP \ pCB1294-RP 三组引物进行 PCR 扩增。鉴定引物见表 1。

1.5　RNA 的提取及 Real-time PCR

取生长约 10 d 的 pCB1294 突变体及 col 野生型幼苗，采用异硫氰酸胍法提取总 RNA，Real-time PCR 分析 pCB-1294 突变体植株中 *miR319b* 基因表达量，以看家基因 *ACTIN2* 作为内参（Varkonyi-Gasic 等，2007）。引物见表 1。

2　结果与分析

2.1　叶边缘锯齿状突变体 pCB1294 的筛选与表型分析

pCB1294 突变体是利用基因激活标签法构建的突变体库中，获得的一个叶片发育异常的突变体。从表型分析可知（图 1），突变体从幼苗期

开始，第一片真叶表现为叶片锯齿状。莲座叶形成时期，突变体叶片基部和顶部都表现为较多锯齿，边缘皱缩。突变体花发育和野生型无太大区别。扫描电镜观察结果表明（图2）：突变体叶片表皮细胞窄小、果荚表面皱缩、果荚表皮细胞异型、叶片表皮腺毛表现为两叉结构，而野生型叶片表皮腺毛为三叉结构，突变体叶表皮腺毛形态发育异常。

表1 引物及其序列

Table 1 Primer and their sequences

引物 Primer	序列 Sequence
特异引物 Special primer	
pCB260LB1	GATTATTGCTCGGGTAGATCGTCTTG
pCB260LB2	CATATGTGGGTTAGCATTCTTTCTG
pCB260LB3	GGTACCAAAACCACCCCAGT
pCB260RB1	ACCTTTTCGAGTATCAATGGAAACTTAACCG
pCB260RB2	CAACGGAGAGTGGCTTGAGATCGGCA
pCB260RB3	CAATGGCCCTTATGGTTTCTGCATCTAG
鉴定引物 Diagnosis primer	
pCB1294-LP	CCGAACAACTAAACTTTCATTC
pCB1294-RP	ACGTACACAGAGCAATATACC
LB3	GGTACCAAAACCACCCCAGT
兼并引物 Degenerate primer	
AD1	NGTCGASWGANAWGAA
AD2	TGWGNAGSANCASAGA
AD3	AGWGNAGWANCAWAGG
AD4	STTGNTASTNCTNTGC
AD5	NTCGASTWTSGWGTT
AD6	WGTGNAGWANCANAGA
Real-time PCR 引物 Real-time PCR primer	
miR319b-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT TCGCACTGGATACGACAGGGAG
miR319b-F	CGGCGGCTTGGACTGAAGGGA
Universal primer-R	GTGCAGGGTCCGAGGT
ACTIN2-F	TATCGCTGACCGTATGAG
ACTIN2-R	CTGAGGGAAGCAAGAATG

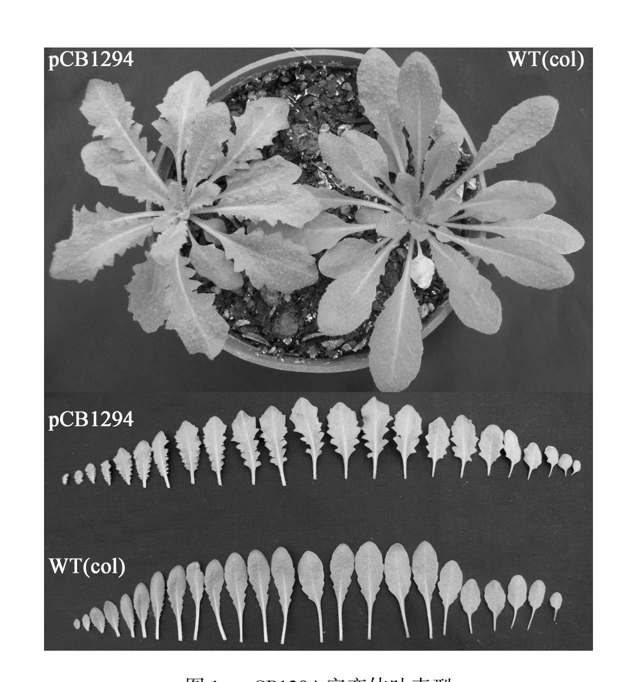


图1 pCB1294突变体叶表型

Fig. 1 pCB1294 mutant phenotype of leaf

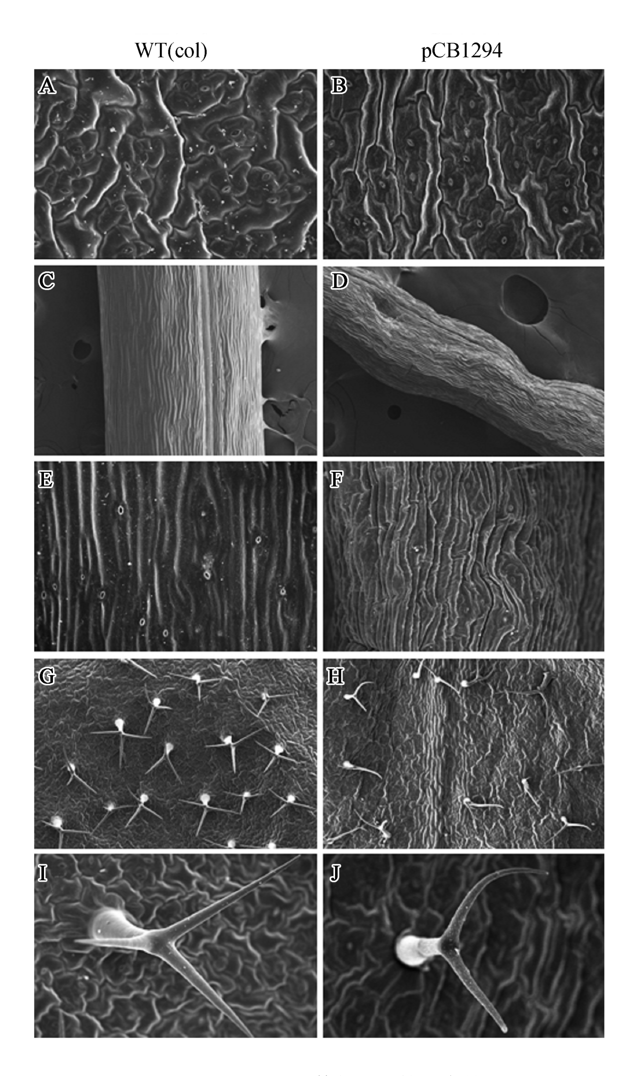


图2 pCB1294突变体扫描电镜观察结果

A. B：叶表皮；C. D. E. F：果荚；G. H. I. J：叶表皮毛

Fig. 2 The scanning electron microscopy observation of pCB1294 mutant

A. B：leaf epidermidis；C. D. E. F：pod；G. H. I. J：leaf trichome

2.2 Tail-PCR定位突变基因

运用Tail-PCR方法，我们成功分离到pCB1294突变体T-DNA侧翼序列，通过序列比对发现T-DNA插入在At5g41663基因的启动子区域，该基因编码*miR319b*，T-DNA为正向插入（图3所

示)，T-DNA 中的 4 个串联的 35S 启动子增强 *miR319b* 基因的表达。

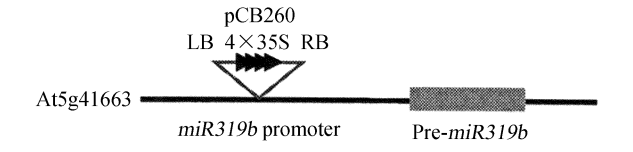


图 3　拟南芥 *At5g41663* 基因结构及 pCB1294 突变体 T-DNA 插入位点（三角形表示 T-DNA 插入位点）
Fig. 3　The structure of *At5g41663* gene and the location of the T-DNA insert (marked with triangles)

2.3　T-DNA 插入位点鉴定

col 野生型植株用 pCB1294-LP 和 pCB1294-RP 引物可扩增出 750bp 左右的特异条带，而另外两组引物不能扩增出条带；pCB1294 突变体用左边界引物（pCB1294-LP）与 T-DNA 引物（LB3）能够扩增出 500 bp 左右的条带，另外两组引物扩增无条带（图 4）。结果表明，通过 tail-PCR 方法扩增的 pCB1294 突变株 T-DNA 插入位点正确，且该突变株是纯合体。

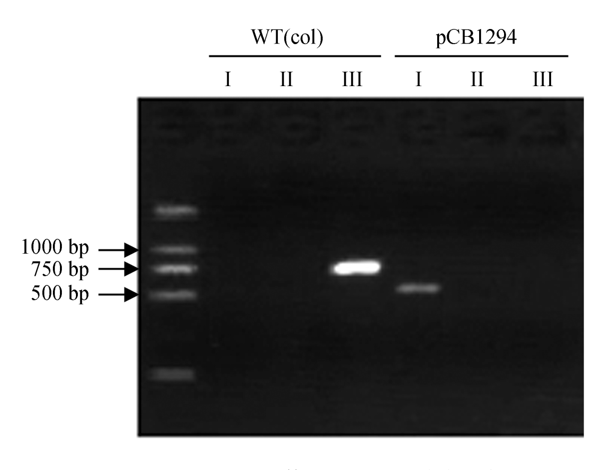


图 4　pCB1294 突变体 T-DNA 插入位点鉴定
I. pCB1294-LP \LB3 引物；II. pCB1294-RP \LB3 引物；III. pCB1294-LP \pCB1294-RP 引物
Fig. 4　Identification of T-DNA insertion sites in pCB1294 mutant
I. pCB1294-LP \LB3 primer; II. pCB1294-RP \LB3 primer; III. pCB1294-LP \pCB1294-RP primer

2.4　Real-time PCR 实验分析突变基因

Real-time PCR 结果表明（图 5）：*miR319b* 基因在 pCB1294 突变体中的表达量比野生型植株高 11 倍多。说明 pCB1294 突变体植株中 *miR319b* 基因的表达得到了极大增强。

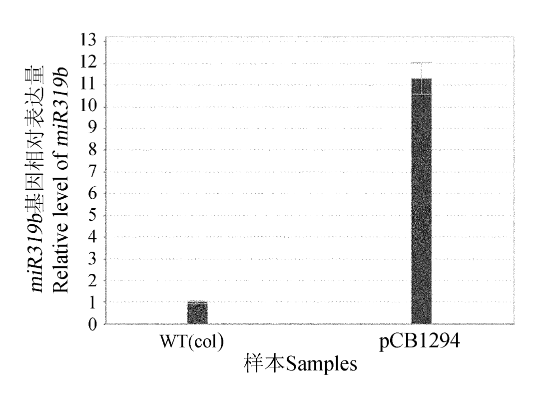


图 5　pCB1294 与 col 植株 *miR319b* 基因表达量的 Real-time PCR 检测
Fig. 5　Real-time PCR analyses of *miR319b* expression level from pCB1294 mutant and col plant

3　讨论

pCB1294 突变体是利用基因激活标签系统突变体库筛选得到的一株叶型锯齿状的突变体。该激活标签突变体库较之先前的 T-DNA 插入突变体库、转座子插入突变体库等具有明显的优势。它运用一个含有 4×35S 超强启动子的 pCB260 质粒进行转化，构建得到的突变体为显性突变，T1 代即可观察表型。pCB260 质粒上带有一个 *Basta* 抗性标记基因（抗除草剂基因）和一个 GFP（绿色荧光蛋白）报告基因，通过 *Basta* 抗性标记基因可以方便地筛选转基因后代植株，GFP 报告基因的利用则可进一步鉴定转基因的可靠性，使得转基因植株的筛选鉴定工作简单、直观（关艳龙等，2009）。

pCB1294 突变体中 T-DNA 插入在 *At5g41663* 基因的启动子区域，该基因编码 *miR319b*。Real-time PCR 结果显示，pCB1294 突变体中 *miR319b* 基因显著增强表达，说明 T-DNA 中 4 个 35S 启动子极大增强了 *miR319b* 基因的表达，该突变体为增强型表达的突变体。突变体在形态上表现为整个叶发育时期叶片边缘锯齿状，边缘皱缩，叶表皮毛表现为两个分叉、结构异常，另外果荚表面皱缩、扭曲，突变体这些异常的表型性状有可能是 *miR319b* 基因增强表达的结果，*miR319b* 基因与植物的叶形态发育密切相关。

研究表明，miRNA 在植物叶极性建立、叶发育方面起重要作用。例如，从拟南芥的激活标签突变体库中分离到的两个突变体 *meristem enlarged1*（*men1*）和 *jabba-1D*（*jab-1D*），突变体表型均为叶片卷曲。突变体表现为 *miR166a* 和 *miR166g* 水平升高（Kim 等，2005；Williams 等，

2005)。*miR159* 和 *miR319* 分别调控 MYB mRNAs 和 TCP mRNAs，其突变体均表现为叶极性改变、发育异常(Palatnik 等，2007)。在拟南芥中，*CUP-SHAPED COTYLEDON2* (*CUC2*) 基因和 *miR164* 基因在叶边缘细胞形成和发育的整个过程中发挥了重要的作用(Nikovics 等，2006)。*miR164* 和 *CUC* 基因的相互平衡共同控制着这一过程。整个叶发育过程中，*miR164a* 突变体叶边缘比野生型具有较多的锯齿，GUS 染色表明 *miR164a* 和 *CUC2* 基因在叶边缘细胞表达。*CUC2* 基因编码 *NAC* 家族转录因子，*miR164* 靶向作用于 *NAC* 基因(Nikovics 等，2006；Guo 等，2005；Baker 等，2005；Schwab 等，2005)。*ARGONUATE1* (*AGO1*) 是 miRNA 介导基因调控，对 PHB 进行调控的一个基因，*AGO1* 通过 miRNA 对 PHB 进行调控，*AGO1* 是 RNA 介导的基因沉默途径中一个主要的成分(Kidner 和 Martienssen，2004)。

研究 miRNA 与植物生长发育的相互关系是植物生物学研究领域中的一个热点，如有研究认为(刘冬梅等，2009) *miR396* 具参与拟南芥花柱头发育的重要功能。但 miRNA 如何调控多个靶基因，其具体的网络调控机制、植物中的 miRNA 和它们的靶基因的探寻等诸多问题还有待深入研究。

本项研究为深入分析 miRNA 功能、miRNA 与靶基因的相互作用关系及调控机制奠定了基础。下一步，我们可利用分离到的 pCB1294 突变体为基础，建立另外一个以 pCB1294 突变体为背景的突变体库，从该突变体库中筛选各种叶形突变体，例如，突变体叶形边缘锯齿状加剧或其他叶形变异突变体，以此深入分析植物叶形态发育与 miRNA 的相互关系，以及探寻更多 *miR319b* 所调控的靶标基因。

〔参 考 文 献〕

Baker CC, Sieber P, Wellmer F *et al.*, 2005. The *early extra petals1* mutant uncovers a role for microRNA *miR164c* in regulating petal number in *Arabidopsis* [J]. *Current Biology*, **15**: 303—315

Guan YL (关艳龙), Li WS (李婉莎), Yin KD (殷奎德) *et al.*, 2010. Constructing and phenotypic analyzing an activation tagging *Arabidopsis* mutant pool [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **32** (1): 53—59

Guo HS, Xie Q, Fei JF *et al.*, 2005. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor *NAC1* to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development [J]. *The Plant Cell*, **17**: 1376—1386

Huang H, 2003. Recent progresses from studies of leaf development [J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), **20** (4): 416—422

Hudson A, 1999. Axioms and axes in leaf formation [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**: 56—60

Kidner CA, Martienssen RA, 2004. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through *ARGONAUTE1* [J]. *Nature*, **428**: 81—84

Kim J, Jung JH, Reyes JL *et al.*, 2005. microRNA-directed cleavage of *ATHB15* mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems [J]. *The Plant Journal*, **42**: 84—94

Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T *et al.*, 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR [J]. *The Plant Journal*, **8**: 457—463

Liu DM (刘冬梅), Yang FX (杨凤玺), Yu DQ (余迪求), 2009. Overexpression of *miR396* miRNAS caused flower stigma curved in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **31** (4): 353—356

Nath U, Crawford BC, Carpenter R *et al.*, 2003. Genetic control of surface curvature [J]. *Science*, **299**: 1404—1407

Nikovics K, Blein T, Peaucelle A *et al.*, 2006. The balance between the *MIR164A* and *CUC2* genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, **18** (11): 2929—2945

Ori N, Cohen AR, Etzioni A *et al.*, 2007. Regulation of *LANCEOLATE* by *miR319* is required for compound-leaf development in tomato [J]. *Nature Genetics*, **39** (6): 787—791

Palatnik JF, Allen E, Wu X *et al.*, 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs [J]. *Nature*, **425**: 257—263

Palatnik JF, Wollmann H, Schommer C *et al.*, 2007. Sequence and expression differences underlie functional specialization of *Arabidopsis* microRNAs *miR159* and *miR319* [J]. *Developmental Cell*, **13** (1): 115—125

Scanlon MJ, 2000. Developmental complexities of simple leaves [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 31—36

Schwab R, Palatnik JF, Riester M *et al.*, 2005. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome [J]. *Developmental Cell*, **8**: 517—527

Smith LG, Hake S, 1992. The initiation and determination of leaves [J]. *The Plant Cell*, **4** (9): 1017—1027

Tsukaya H, 2005. Leaf shape: Genetic controls and environmental factors [J]. *International Journal of Developmental Biology*, **49**: 547—555

Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M *et al.*, 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs [J]. *Plant Methods*, **3** (1): 12

Williams L, Grigg SP, Xie M *et al.*, 2005. Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA *miR166g* and its *AtHD-ZIP* target genes [J]. *Development*, **132**: 3657—3668

Yu L, Yu XH, Shen RJ *et al.*, 2005. *HYL1* gene maintains venation and polarity of leaves [J]. *Planta*, **221**: 223—422